

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 8 - 3 3 6 3 8 8

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 12 月 24 日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 9/24			C12N 9/24	
C07H 21/04			C07H 21/04	B
C12N 1/21		7804-4B	C12N 1/21	
15/09	ZNA		C12P 19/14	Z
C12P 19/14		9162-4B	C12N 15/00	ZNA A
審査請求 未請求 請求項の数 28 F D (全 22 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平 7 - 1 8 9 7 6 0

(22) 出願日 平成 7 年 (1995) 7 月 4 日

(31) 優先権主張番号 特願平 6 - 1 9 0 1 8 0

(32) 優先日 平 6 (1994) 7 月 21 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平 7 - 1 0 9 1 2 8

(32) 優先日 平 7 (1995) 4 月 11 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 0 0 0 1 5 5 9 0 8

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号

(72) 発明者 三▲つづみ▼ 仁志

岡山県岡山市桑野 5 2 5 番 3 - 1 0 2 号

(72) 発明者 久保田 倫夫

岡山県岡山市四御神 1 番 3 0

(72) 発明者 杉本 利行

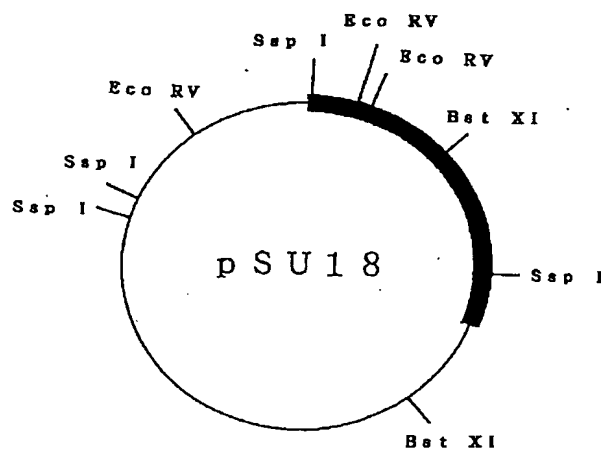
岡山県岡山市東畦 6 9 5 番 4 4 号

(54) 【発明の名称】 非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型耐熱性酵素

(57) 【要約】

【目的】 末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型耐熱性酵素、その組換え型耐熱性酵素をコードする DNA とその DNA を含む組換え DNA と形質転換体、その形質転換体を利用する組換え型耐熱性酵素の製造方法、さらには、組換え型耐熱性酵素による非還元性糖質の酵素的変換方法を提供する。

【構成】 特定の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素と、その組換え型耐熱性酵素をコードする DNA と、その DNA と自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換え DNA と、その組換え DNA を適宜宿主に導入してなる形質転換体と、その形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法と、末端にトレハロース構造を有する特定の非還元性糖質に組換え型耐熱性酵素を作用させてトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元性糖質の酵素的変換方法を要旨とする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素。

## (1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する。

## (2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約54,000乃至64,000ダルトンを示す。

## (3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.6乃至6.6に等電点を示す。

## (4) 熱安定性

水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても実質的に失活しない。

【請求項2】 配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列又はそれに相等的なアミノ酸配列を有する請求項1に記載の組換え型耐熱性酵素。

【請求項3】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNA。

【請求項4】 配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相等的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項3に記載のDNA。

【請求項5】 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項3又は4に記載のDNA。

【請求項6】 スルフォロブス属の微生物に由来する請求項3、4又は5に記載のDNA。

【請求項7】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相等的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項10】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項7、8又は9に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項11】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBluescript II SK(+)又はpKK223-3である請求項7、8、9又は10に記

載の複製可能な組換えDNA。

【請求項12】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項13】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相等的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項12に記載の形質転換体。

10 【請求項14】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項12又は13に記載の形質転換体。

【請求項15】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項12、13又は14に記載の形質転換体。

【請求項16】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBluescript II SK(+)又はpKK223-3である請求項12、13、14又は15に記載の形質転換体。

【請求項17】 宿主が大腸菌である請求項12、13、14、15又は16に記載の形質転換体。

【請求項18】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法。

30 【請求項19】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相等的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項18に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項20】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項18又は19に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項21】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項18、19又は20に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項22】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBluescript II SK(+)又はpKK223-3である請求項18、19、20又は21に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項23】 宿主が大腸菌である請求項18、19、20、21又は22に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項24】 培養物中の組換え型耐熱性酵素を遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、分別沈澱、イオン交換

クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項 1 8、1 9、2 0、2 1、2 2 又は 2 3 に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項 2 5】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質に請求項 1 乃至 2 に記載の組換え型耐熱性酵素を作用させてトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元性糖質の酵素的変換方法。

【請求項 2 6】 非還元性糖質濃度が 5 0 % (w/w) 以下の水溶液中に組換え型耐熱性酵素を共存せしめ、5 5℃を越える温度で作用させる請求項 2 5 に記載の非還元性糖質の酵素的変換方法。

【請求項 2 7】 グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖に非還元性糖質生成酵素を作用させ、生成した非還元性糖質に組換え型耐熱性酵素を作用させる請求項 2 5 又は 2 6 に記載の非還元性糖質の酵素的変換方法。

【請求項 2 8】 非還元性糖質が  $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース又は  $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースである請求項 2 5、2 6 又は 2 7 に記載の非還元性糖質の酵素的変換方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】 この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型耐熱性酵素に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 トレハロースは、グルコース 2 分子が還元性基同士結合した二糖類であり、天然には細菌、真菌、藻類、昆虫などに微量存在する。トレハロースは分子中に還元性基を持たないので、アミノ酸類の存在下で加熱しても褐変反応を起こすことがなく、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできる利点がある。しかしながら、従来の方法では所望量入手するのが難しく、実際に飲食物の甘味付けに使われることは殆どなかった。

【0 0 0 3】 これまでの製造方法は、微生物の菌体を利用する方法と、糖質に複合酵素系を作用させる方法とに大別される。前者の方法は、特開昭 5 0 - 1 5 4 4 8 5 号公報などにも見られるように、細菌、酵母などの微生物を栄養培地で増殖させ、主として菌体からトレハロースを採取するものである。一方、後者の方法は、特開昭 5 8 - 2 1 6 6 9 5 号公報などにもみられるように、基質にマルトースを使用し、これにマルトース・フォスホリラーゼとトレハロース・フォスホリラーゼからなる複合酵素系を作用させ、生成したトレハロースを系外に取出すものである。前者の方法は、微生物そのものの

増殖は比較的容易なものの、菌体に含まれるトレハロースが高々 1 5 % (w/w) と僅少であるという問題があった。後者の方法は、トレハロースそのものの分離は比較的容易なものの、反応自体が 2 種類の酵素による平衡反応であり、しかも、その平衡が常時グルコース磷酸側に傾いていることから、基質を高濃度にして反応させ、トレハロースの収量を上げるのが原理的に難しかった。

【0 0 0 4】 斯かる状況に鑑み、本発明者が、澱粉糖からトレハロース構造を有する糖質を生成する酵素につき鋭意検索したところ、リゾビウム属やアルスロバクター属に属するある種の微生物がグルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来未知の全く新規な酵素を産生することを見出し、特願平 5 - 3 4 9 2 1 6 号明細書に開示した。この知見とあい前後して、この非還元性糖質は、同じくリゾビウム属やアルスロバクター属に属する微生物が産生する別の酵素により、ほぼ定量的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖に加水分解されることも見出した。

【0 0 0 5】 ところが、上記微生物が産生する酵素は、いずれも 4 0℃付近に至適温度を有しており、実際にトレハロースの製造に使用するには熱安定性にやや難のあることが判明した。すなわち、斯界においては、澱粉や澱粉質を糖化するには、一般に、5 5℃を越える温度で反応させるのが望ましいとされており、これは、5 5℃以下で糖化すると雑菌汚染が顕著となり、反応物の pH が低下して酵素が失活したり、これにより、大量の基質が未反応のまま残存したりすることによる。敢えて熱安定性に劣る酵素で糖化しようとする、pH の推移に多大の注意を払わなければならない、万一、pH が顕著に低下した場合には、反応物にアルカリ等を加えて可及的速やかに pH を上昇させるなどの対策を講じなければならない。

【0 0 0 6】 斯かる状況に鑑み、本発明者らが、斯かる作用ある耐熱性酵素につき引続き検索したところ、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC 33909) を始めとするスルフォロブス属の微生物が産生する酵素は、5 5℃を上回る温度で反応させても、実質的に失活することなく、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質から効率的にトレハロースを遊離することを見出した。しかしながら、これら微生物は酵素の産生能が充分でなく、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質からトレハロースを大規模に製造しようとする、微生物を大量に培養しなければならないという問題がある。

【0 0 0 7】 一方、昨今の組換え DNA 技術の進歩には目覚ましいものがある。今日では、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードする DNA を含む組換え DNA を作製し、これを

微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。斯かる状況に鑑み、上記耐熱性酵素をコードする遺伝子を突き止め、その塩基配列を解明するのが急務となっている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】この発明の目的は、組換えDNA技術を応用することにより、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型耐熱性酵素を創製することにある。

【0009】この発明の別の目的は、その創製された組換え型耐熱性酵素をコードするDNAを提供することにある。

【0010】この発明のさらに別の目的は、斯かるDNAを含む複製可能な組換えDNAを提供することにある。

【0011】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換えDNAを導入した形質転換体を提供することにある。

【0012】この発明のさらに別の目的は、斯かる形質転換体を利用する、組換え型耐熱性酵素の製造方法を提供することにある。

【0013】この発明のさらに別の目的は、組換え型耐熱性酵素を利用する、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する酵素的変換方法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記第一の課題を、下記の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素により解決するものである。

(1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する。

(2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約54,000乃至64,000ダルトンを示す。

(3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.6乃至6.6に等電点を示す。

(4) 温度安定性

水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても、実質的に失活しない。

【0015】この発明は、前記第二の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAにより解決するものである。

【0016】この発明は、前記第三の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0017】この発明は、前記第四の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【0018】この発明は、前記第五の課題を、上記組換え型酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法により解決するものである。

【0019】この発明は、前記第六の課題を、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質に上記組換え型耐熱性酵素を作用させてトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元性糖質の酵素的変換方法により解決するものである。

【0020】

【作用】この発明の組換え型耐熱性酵素は、55℃を超える温度で反応させても、実質的に失活することなく、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する。

【0021】この発明のDNAは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して複製可能な組換えDNAとし、これを、通常、当該酵素を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該酵素の産生を発現する。

【0022】この発明の組換えDNAは、通常、当該酵素を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該酵素の産生を発現する。

【0023】この発明の形質転換体は、培養すると、当該酵素を産生する。

【0024】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養すれば、所望量の当該酵素が容易に得られる。

【0025】この発明の酵素的変換方法により、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質は、トレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換される。

【0026】この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する、従来未知の全く新規な耐熱性酵素の発見に基づくものである。斯かる酵素はスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の培養物から得ることができ、本発明者がカラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合わせてこの酵素を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質はポリペプチドであり、次のような理化学的性質を有することが判明した。

(1) 作用

50 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以

上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する。

(2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約54,000乃至64,000ダルトンを示す。

(3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.6乃至6.6に等電点を示す。

(4) 至適温度

pH6.0で30分間反応させると、75℃付近に至適温度を示す。

(5) 至適pH

60℃で30分間反応させると、pH5.5乃至6.0付近に至適pHを示す。

(6) 熱安定性

pH7.0で60分間インキュベートすると、85℃付近まで安定である。

(7) pH安定性

25℃で16時間インキュベートすると、pH5.5乃至9.5まで安定である。

【0027】次に、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)が産生する耐熱性酵素の理化学的性質を解明すべく行った実験について説明する。

【0028】

【実験例1 精製酵素の調製】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 燐酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、硫酸を加えてpH3.0に調整した。この液体培地にスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)を接種し、75℃、130rpmで24時間回転振盪培養して第一の種培養液を得た。10l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、第一の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養して第二の種培養液を得た。その後、300l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約250lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、第二の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量100l/分で42時間通気攪拌培養した。

【0029】約170lの培養物をSF膜により膜濾過し、遠心分離して得られた湿重量約258gの菌体を10mM燐酸緩衝液(pH7.0)300mlに浮遊させ、超音波を印加して菌体を破碎した。破碎物を10,000rpmで30分間遠心分離し、得られた約300mlの上清に硫酸アンモニウムを70%飽和になるよう

に加え、4℃で24時間静置後、10,000rpmで30分間遠心分離した。沈澱部を採取し、適量の10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に溶解し、新鮮な同じ緩衝液に対して24時間透析後、10,000rpmで30分間遠心分離して酵素活性ある約300mlの上清を得た。

【0030】この上清を予め10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE-トヨパール』約360mlのカラムに負荷し、0Mから0.3Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)を通液した。塩化ナトリウム濃度0.1M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、1M硫酸アンモニウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に対して10時間透析し、遠心分離により不溶物を除去した後、予め1M硫酸アンモニウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいた東ソー製疎水クロマトグラフィー用ゲル『ブチルトヨパール650』約350mlのカラムに負荷し、1Mから0Mに低下する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)を通液した。

【0031】硫酸アンモニウム濃度0.2M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、0.2M塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に対して16時間透析し、遠心分離により不溶物を除去した後、予め0.2M塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいた東ソー製ゲル濾過クロマトグラフィー用ゲル『トヨパールHW-55』約350mlのカラムに負荷し、カラムに0.2M塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)を通液した。溶出液から酵素活性ある画分を採取し、1M硫酸アンモニウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に対して16時間透析し、遠心分離により不溶物を除去した後、ブチルトヨパール650を使用する疎水クロマトグラフィーを再度適用し、溶出液から酵素活性ある画分を採取した。この画分を予め10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいたファルマシア製ゲル濾過クロマトグラフィー用カラム『スーパーローズ12 HR 10/30』に負荷し、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)を通液して得られる溶出液から酵素活性ある画分を採取した。このようにして調製した精製酵素の比活性は約730単位/mg蛋白質であり、収量は培養物1l当たり約0.86単位であった。

【0032】常法により、この精製酵素を7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動したところ、ゲル上には酵素活性を伴う実質的に単一のバンドが観察され、精製酵素が極めて高純度であることが窺われた。

【0033】なお、この発明を通じて、耐熱性酵素の活性は次の方法により測定した活性値(単位)で表示する。すなわち、基質として $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロースを1.25% (w/v) 含む50mM磷酸緩衝液(pH6.0)を4mlとり、これに適宜希釈した酵素液を1ml加え、60℃で30分間インキュベートして反応させた後、反応物を1mlとり、ソモギ銅液2mlに加えて反応を停止させ、ソモギーネルソン法により還元力を測定する。同時に、予め100℃で30分間加熱して失活させておいた酵素液を使用する系を設け、上記と同様に処置して対照とする。耐熱性酵素の1単位とは、上記反応条件下において、1分間に1 $\mu$ molのグルコースに相当する還元力を増加させる酵素の量と定義する。

【0034】

【実験例2 耐熱性酵素の理化学的性質】

【0035】

【実験例2-1 作用】基質として $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトト

リオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース又は $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースを50mM酢酸緩衝液(pH5.5)に20% (w/v) になるように溶解し、これに実験例1で調製した精製酵素を基質固形分1g当たり2単位加え、60℃で48時間反応させた。反応物を常法により脱塩後、和光純薬工業製高速液体クロマトグラフィー用カラム『WB-T-330』を使用する高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により糖組成を分析した。高速液体クロマトグラフィーは室温下で実施し、溶出液を東ソー製示差屈折計『RI-8012型』でモニタしながら、溶離液として水を0.5ml/分の流速で通液した。別途、基質としてマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース又はマルトヘプタオースを使用する5種類の系を設け、これらを上記と同様に処置して対照とした。結果を表1に示す。

【0036】

【表1】

基質	反応物中の糖質	HPLC溶出時間 (分)	組成 (%)
$\alpha$ -グルコシルトレハロース	トレハロース	27.4	7.2
	グルコース	33.8	3.9
	$\alpha$ -グルコシルトレハロース	23.3	88.9
$\alpha$ -マルトシルトレハロース	トレハロース	27.4	40.2
	マルトース	28.7	40.5
	$\alpha$ -マルトシルトレハロース	21.6	19.3
$\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース	トレハロース	27.4	41.1
	マルトトリオース	25.9	58.2
	$\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース	19.7	0.7
$\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース	トレハロース	27.4	34.0
	マルトテトラオース	24.1	65.8
	$\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース	18.7	0.2
$\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロース	トレハロース	27.4	29.1
	マルトペンタオース	22.6	70.6
	$\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロース	17.8	0.3
マルトトリオース	マルトトリオース	25.9	100
マルトテトラオース	マルトテトラオース	24.1	100
マルトペンタオース	マルトペンタオース	22.6	100
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	21.8	100
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	21.0	100

【0037】表1の結果は、精製酵素が末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースとグルコース又はマルトオリゴ糖をほぼ定量的に遊離する一方、グルコース重合度3以上のマルトオリゴ糖には全く作用しなかったことを示している。これらの事実は、精製酵素が末端にトレハロース構

造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質に選択的に作用し、そのトレハロース残基とグリコシル残基間のグリコシド結合を特異的に加水分解することを示唆している。斯かる酵素作用は未だ報告されておらず、全く新規な作用機序を辿るものと推定される。

【0038】

【実験例2-2 分子量】ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、第680乃至685頁(1970年)に報告している方法に準じて精製酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量約54,000乃至64,000ダルトンに相当する位置に酵素活性を伴う単一バンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ミオシン(200,000ダルトン)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(116,250ダルトン)、フォスホリラーゼB(97,400ダルトン)、血清アルブミン(66,200ダルトン)及びオ

ボアルブミン(45,000ダルトン)であった。

【0039】

【実験例2-3 等電点】2% (w/v) アンフォラインを含むポリアクリルアミドゲル上で精製酵素を等電点電気泳動したところ、約5.6乃至6.6に等電点を示した。

【0040】

【実験例2-4 至適温度】常法により、20mM 磷酸緩衝液(pH6.0)中、相違する温度で30分間反応させたところ、図1に示すように、精製酵素は75℃付近に至適温度を示した。

【0041】

【実験例2-5 至適pH】常法により、pHの相違するマッキルヴェイン氏緩衝液中、60℃で30分間反応させたところ、図2に示すように、精製酵素はpH5.5乃至6.0付近に至適pHを示した。

【0042】

【実験例2-6 熱安定性】常法により、50mM 磷酸緩衝液(pH7.0)中、相違する温度で60分間インキュベートしたところ、図3に示すように、精製酵素は85℃付近まで安定であった。

【0043】

【実験例2-7 pH安定性】常法により、pHの相違するマッキルヴェイン氏緩衝液又は50mM 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、25℃で16時間インキュベートしたところ、図4に示すように、精製酵素はpH5.5乃至9.5付近まで安定であった。

【0044】

【実験例2-8 N末端アミノ酸配列】常法により、バーキン・エルマー製気相プロテイン・シーケンサ『473A型』を使用して分析したところ、精製酵素はN末端に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有していた。

【0045】

【実験例2-9 部分アミノ酸配列】精製酵素を適量とり、10mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)に対して4℃で18時間透析後、10mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を加えて酵素濃度約1mg/mlとした。この溶液を約1mlとり、リジルエンドペプチダーゼを10 $\mu$ g加え、30℃で64時間インキュベートし

て酵素を部分加水分解した。加水分解物を、予め8% (v/v) 水性アセトニトリルを含む0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた日本ミリポア・リミテッド製高速液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロボンドバックC18』に負荷し、8% (v/v) から48% (v/v) に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を0.9ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約57分後に溶出したペプチド断片を含む画分を採取し、真空乾燥後、50% (v/v) 水性アセトニトリルを含む0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、実験例2-8と同様に分析したところ、ペプチド断片は配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列を有していた。

【0046】以上のような理化学的性質を有する酵素は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。

【0047】そこで、本発明者が、配列表における配列番号3及び4に示す部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の染色体DNAを鋭意検索したところ、配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列を有する約1,700塩基対からなるDNA断片が得られた。そして、その塩基配列を解読したところ、同微生物が産生する耐熱性酵素は556個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0048】配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列及び塩基配列を解明するに到った一連の工程を要約すると、次のようになる。

(1) 供与体微生物の培養物から耐熱性酵素を分離し、高度に精製後、N末端アミノ酸配列を決定した。一方、その精製酵素をプロテアーゼにより部分加水分解し、加水分解物からペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

(2) 別途、供与体微生物の菌体より染色体DNAを分離し、精製後、制限酵素により部分消化し、消化物から約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。DNAリガーゼにより、このDNA断片を予め制限酵素で切断しておいたプラスミドベクターに連結し、組換えDNAを作製した。

(3) 大腸菌にこの組換えDNAを導入して形質転換体を作製し、前記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションにより当該酵素をコードするDNAを含む形質転換体を選択した。

(4) 形質転換体から組換えDNAを採取し、プライマーとともにアニーリング後、DNAポリメラーゼを用させてプライマーを伸長し、得られた相補鎖DNAをジオキシ・チェーン・ターミネータ法により分析して塩



基配列を決定した。そして、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列とを比較し、その塩基配列が当該酵素をコードしていることを確認した。

【0049】次の実験例3及び4では、上記(2)乃至(4)の工程を具体的に説明するが、これら実験例で用いる手法自体は斯界において公知のものであり、例えば、ジェー・サムブルック等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行などにも詳述されている。

【0050】

【実験例3 耐熱性酵素をコードするDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製】

【0051】

【実験例3-1 染色体DNAの調製】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 燐酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、硫酸を加えてpH3.0に調整した。この液体培地にスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)を接種し、75℃、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。10l容ファーメンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、上記で得た種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養した。

【0052】遠心分離により培養物から採取した菌体をTES緩衝液(pH8.0)に浮遊させ、リゾチームを0.05% (w/v) 加えた後、37℃で30分間インキュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結し、TSS緩衝液(pH9.0)を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、氷冷後、遠心分離により上清を採取した。この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈澱した粗染色体DNAを採取し、SSC緩衝液(pH7.1)に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテアーゼをそれぞれ7.5μg又は125μg加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。反応物にクロロホルム/イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈澱を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1mg/mlになるようにSSC緩衝液(pH7.1)に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。

【0053】

【実験例3-2 組換えDNA pSU18と形質転換

体SU18の調製】実験例3-1で得た精製染色体DNA溶液を1mlとり、これに制限酵素Sau3AIを約35単位加え、37℃で20分間反応させて染色体DNAを部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、ストラタジーン・クローニング・システムズ製プラスミドベクター『Bluescript IISK(+)]を1μgとり、常法により制限酵素BamHIを作用させて完全に切断した後、上記で得たDNA断片10μgとT4 DNAリガーゼを2単位加え、4℃で一夜静置することによりDNA断片に連結した。得られた組換えDNAにストラタジーン・クローニング・システムズ製コンピテントセル『Episcurian Coli XLI-Blue』を30μl加え、氷冷下で30分間静置後、42℃に加温し、SOCブrossを加え、37℃で1時間インキュベートして組換えDNAを大腸菌に導入した。

【0054】このようにして得た形質転換体を5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシドを50μg/ml含む寒天平板培地(pH7.0)に接種し、37℃で18時間培養後、培地上に形成された約7,000個のコロニーをナイロン膜上に固定した。別途、常法により、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列のPhe-Lys-Leu-Trp-Ala-Proで表わされる配列に基づき5'-TTYAARYTNTGGGCNCC-3'で表わされる塩基配列のプロープ1を化学合成し、同位体<sup>32</sup>Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した12種類の形質転換体を選択した。

【0055】常法により、これら12種類の形質転換体から組換えDNAを採取する一方、配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列のGln-Trp-Val-Asp-Asp-Phe-Hisで表わされる配列に基づき化学合成した5'-CARTGGGTNGAYGAYTTYCA-3'で表わされる塩基配列のプロープ2を同位体<sup>32</sup>Pで標識後、イー・エム・サザン『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第98巻、第503乃至517頁(1975年)に記載されている方法に準じて上記組換えDNAにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した組換えDNAを選択した。このようにして得た組換えDNA及び形質転換体を、それぞれ、『pSU18』、『SU18』と命名した。

【0056】形質転換体SU18をアンピシリン100μg/mlを含むL-ブross培地(pH7.0)に接種し、37℃で24時間回転振盪培養し、培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ法により組換えDNAを菌体外に溶出させた。処理物を常法により精製し、分析したところ、組換えDNA pSU18は約6,000塩基対からなり、図5に示すよう

に、当該酵素をコードする約1,700塩基対からなるDNAを制限酵素Ssp Iによる切断部位の下流に連結していた。

【0057】

【実験例3-3 形質転換体SU18による組換え型耐熱性酵素の産生】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 燐酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地 (pH7.0) を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、アンピシリンを50μg/ml加えた。この液体培地に実験例3-2で調製した形質転換体SU18を接種し、37℃、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、10l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、37℃まで冷却後、アンピシリンを50μg/ml加え、種培養液を1% (v/v) 接種し、37℃、通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養した。培養物を常法により超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去した後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物1l当たり約30単位の組換え型耐熱性酵素が検出された。

【0058】対照として、大腸菌XL1-Blue株又はスルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC33909) をアンピシリン無含有の上記と同一組成の液体培地を使用し、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC33909) の場合、始発pH及び培養温度をそれぞれ3.0及び75℃に設定した以外は上記と同様に培養・処理した。処理物の酵素活性を測定したところ、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC33909) による耐熱性酵素の産生は培養物1l当たり約2単位と、形質転換体SU18と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌XL1-Blue株は耐熱性酵素を全く産生しなかった。

【0059】その後、形質転換体SU18が産生した組換え型耐熱性酵素を実験例1乃至2の方法により精製し、その性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約54,000乃至64,000ダルトンと等電点電気泳動で約5.6乃至6.6に等電点を示すとともに、水溶液 (pH7.0) 中、85℃で60分間インキュベートしても実質的に失活しないなど、供与体微生物であるスルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC33909) が産生する耐熱性酵素とほぼ同じ理化学的性質を有していた。このことは、組換えDNA技術によっても耐熱性酵素を製造でき、且つ、その生産性も有意に向上することを示唆している。

【0060】

【実験例4 相補鎖DNAの調製並びにその塩基配列及びアミノ酸配列の決定】実験例3-2で得た組換えDNA pSU18を2μgとり、これに2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて変性させた後、適量の冷エタノールを加え、生成したテンプレートDNAを含む沈澱を採取し、真空乾燥した。このテンプレートDNAに化学合成した5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'で表わされる塩基配列のプライマーを50pmol/mlと、20mM塩化マグネシウムと塩化ナトリウムを含む40mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) を10μl加え、65℃で2分間インキュベートしてアニーリングした後、dATP、dGTP及びdTTPをそれぞれ7.5μM含む水溶液を2μlと、[α-<sup>32</sup>P] dCTP (2mCi/ml) を0.5μlと、0.1Mジチオスレイトールを1μlと、1.5単位/mlのT7 DNAポリメラーゼを2μl加え、25℃で5分間インキュベートすることによりプライマーを5'末端から3'末端に向かって伸長させ、相補鎖DNAを生成させた。

【0061】次に、上記で得た相補鎖DNAを含む反応物を四等分し、それぞれにddATP、ddCTP、ddGTP及びddTTPのいずれかを8μMと80μM dNTPを含む50mM塩化ナトリウム水溶液を2.5μl加え、37℃で5分間インキュベートして反応させ、20mM EDTA、0.05% (w/v) ブロムフェノールブルー及び0.05% (w/v) キシレンシアノールを含む98% (v/v) 水性ホルムアミド溶液を4μl加えて反応を停止させた。反応物を沸騰水中で3分間加熱後、6% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上にとり、約2,000Vの定電圧を印加しながら電気泳動してDNA断片を分離し、次いで、常法によりゲルを固定し、乾燥させた後、オートラジオグラフィーした。

【0062】ラジオグラム上に分離したDNA断片を分析した結果、相補鎖DNAは配列表における配列番号5に示す約1,700塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列はその配列番号5に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号3及び4に示す部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号3の配列は配列番号5における第1乃至30番目の配列に、また、配列番号4の配列は配列番号5における第301乃至319番目の配列に一致した。これは、この発明の組換え型耐熱性酵素が配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列を有することあり、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC33909) 由来のDNAにおいては、そのアミノ酸配列が配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列によりコードされていることを示している。

【0063】以上説明したように、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質が

らトレハロースを遊離する耐熱性酵素は、本発明者の長年に亘る研究の成果として見出されたものであり、従来公知の酵素には見られない独特の理化学的性質を具備している。この発明は、組換えDNA技術を応用することにより、この耐熱性酵素を創製しようというものである。以下、実施例等を参照しながら、この発明の組換え型耐熱性酵素並びにその製造方法及び用途につき、具体的に説明する。

【0064】この発明でいう組換え型耐熱性酵素とは、組換えDNA技術により創製され、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する耐熱性酵素全般を意味する。この発明の組換え型耐熱性酵素は、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例えば、配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列又はそれに相等的なアミノ酸配列が挙げられる。配列番号1に示すアミノ酸配列に相等的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の理化学的性質を実質的に変えることなく、配列番号1のアミノ酸配列における構成アミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成や培養温度・pHなどに依っては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の理化学的性質は保持しているものの、配列番号1に示すアミノ酸配列におけるN末端付近のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の產生することがある。斯かる変異体も、それが所期の理化学的性質を具備しているかぎり、当然、この発明の組換え型耐熱性酵素に包含される。

【0065】この発明による組換え型耐熱性酵素は、特定のDNAを含む形質転換体の培養物から採取することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相等的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基に置き換えてもよい。また、DNAが宿主中で実際に当該酵素の産生を発現するために、当該酵素又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは言うまでもない。

【0066】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)を含むスルフォロブス属の微生物が挙げられる。これら微生物の菌体からはこ

の発明のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に接種し、好気的条件下で約1日乃至3日間培養後、培養物から菌体を採取し、リゾチームや $\beta$ -グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理することにより当該DNAを含む遺伝子を菌体外に溶出させる。このとき、細胞壁溶解酵素にプロテアーゼなどの蛋白質加水分解酵素を併用したり、菌体を超音波処理する際、SDSなどの界面活性剤を共存させたり凍結融解してもよい。斯くして得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコール沈澱、遠心分離、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理などの斯界における通常一般の方法を適用すれば目的のDNAが得られる。一方、DNAを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号2に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を採取し、その菌体から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0067】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、pBR322、pUC18、Bluescript I I SK (+)、pKK223-3、pUB110、pTZ4、pC194、pHV14、TRp7、YEp7、pBS7などのプラスミドベクターや $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ C、 $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ B、 $\rho$ 11、 $\phi$ 1、 $\phi$ 105などのファージベクターが挙げられる。このうち、この発明のDNAを大腸菌で発現させるにはpBR322、pUC18、Bluescript I I SK (+)、pKK223-3、 $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ C及び $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ Bが好適であり、一方、枯草菌で発現させるにはpUB110、pTZ4、pC194、 $\rho$ 11、 $\phi$ 1及び $\phi$ 105が好適である。pHV14、TRp7、YEp7及びpBS7は、組換えDNAを二種以上の宿主内で複製させる場合に有用である。

【0068】DNAを斯かるベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、まず、DNAを含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、I I型の制限酵素、詳細には、Sau 3A I、EcoR I、Hind I I I、Bam H I、Sal I、Xba I、Sac I、Pst I、Ban I I I、Ssp I、Bst X I、Hpa Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片

を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0069】このようにして得られる組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主微生物に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、末端トレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質を含む栄養培地で培養し、該糖質よりトレハロースを遊離するものを選択すればよい。

【0070】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に当該酵素を産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖、トレハロースなどの糖源が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニア塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コンスティープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に接種し、栄養培地を温度20乃至65℃、pH2乃至9に保ちつつ、通気攪拌などによる好気的条件下で約1乃至6日間培養すれば、当該酵素を含む培養物が得られる。この培養物は酵素剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより酵素を菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精製には酵素を精製するための通常に方法が採用でき、例えば、菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に濃縮、塩析、透析、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの1種又は2種以上を適宜組合わせて適用すればよい。

【0071】前述のとおり、この発明による組換え型耐熱性酵素は、55℃を越える温度で反応させても、実質的に失活することなく、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離するという、従来の酵素には見られない独特の性質を有する。トレハロースはまろやかで上品な甘味を有し、そして、何よりも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできるという大きな利点がある。当該酵素のこの性質を利用す

ることにより、従来、還元性故に敬遠されがちであった種々の澱粉糖を、還元性を有しないか還元性が顕著に低下した、扱い易い、有用な糖質に変換できることとなる。

【0072】斯かる変換方法につきさらに説明すると、この発明による組換え型耐熱性酵素の基質には $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースなどの末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質が用いられる。斯かる非還元性糖質は、澱粉又はアミロペクチン、アミロースなどの澱粉質を酸及び/又はアミラーゼにより部分加水分解して得られるグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖に、例えば、特願平5-349216号明細書や同じ特許出願人による特願平6-166011号明細書に開示されている非還元性糖質生成酵素を作用させることにより得ることができる。これら非還元性糖質生成酵素の基質となり得るグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖は、通常、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース重合度3以上のマルトオリゴ糖の1種又は2種以上を含んでなる。アミラーゼ研究会編『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ』、1988年、バーガモン・プレス発行に記載されている $\alpha$ -アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ及びマルトヘキサオース生成アミラーゼは、斯かる還元性澱粉糖の調製に特に有用であり、これらアミラーゼのいずれかを使用することにより、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を豊富に含む澱粉糖混合物が容易且つ効率的に得られる。なお、このとき、必要に応じて、ブルナーゼやイソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素を併用すれば、非還元性糖質生成酵素の基質となり得る還元性澱粉糖の収量を上げることができる。斯かる還元性澱粉糖の1種又は2種以上を濃度50% (w/w) まで含む水溶液に非還元性糖質生成酵素を適量共存せしめ、水溶液を、通常、温度40乃至85℃に、また、pHを約4乃至8の範囲に保ちつつ、所望量の非還元性糖質が生成するまで反応させる。

【0073】この発明による変換方法においては、通常、基質として上記したような非還元性糖質の1種又は2種以上を含む水溶液にこの発明の組換え型耐熱性酵素を共存せしめ、水溶液を所定の温度、pHに保ちつつ、所望量のトレハロースが遊離するまで反応させる。反応は0.1% (w/w) 程度の基質濃度下でも進行するが、この発明による変換方法を大規模に実施する場合には、より高濃度の2% (w/w) 以上、望ましくは、5乃至50% (w/w) とするのがよい。反応時の温度とpHは組換え型耐熱性酵素が失活することなく基質に効

率的に作用するレベルに設定され、温度は 55℃を越え、85℃を越えないレベルに、望ましくは、約 56 乃至 70℃に、また、pH は 4 乃至 7、望ましくは、約 5 乃至 6 の範囲に設定される。組換え型耐熱性酵素の量と反応時間は、反応の進行具合に依って適宜に設定する。斯くして、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質は効率的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換され、 $\alpha$ -マルトリオシルトレハロースの場合、変換率は約 99%にも達する。澱粉加水分解物に前記アミラーゼのいずれかと、非還元性糖質生成酵素及び当該酵素を同時に作用させるときには、非還元性糖質が生成すると同時にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖に分解されるので、トレハロース含量の高い糖組成物が収量良く、効率的に得られる実益がある。

【0074】この発明の変換方法により得られた反応物はそのまま使用可能ではあるが、通常、使用に先立ち精製する。すなわち、濾過、遠心分離などにより反応物から不溶物を除去し、活性炭により脱色した後、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮してシロップ状物とする。用途に依っては、このシロップ状物を真空乾燥、噴霧乾燥などにより固状物としてもよい。実質的にトレハロースのみからなる製品を得るには、上記シロップ状物にイオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどによる糖質を分離するための種々のクロマトグラフィー、アルコール、アセトンなどによる分別沈澱、膜濾過、酵母による発酵、アルカリによる還元性糖質の分解除去などの 1 種又は 2 種以上を適用する。大量に反応物を処理するには、例えば、特開昭 58-23799 号公報や特開昭 58-72598 号公報に開示されている強酸性カチオン交換樹脂を使用する固定床方式、移動床方式又は疑似移動床方式のイオン交換クロマトグラフィーが有用であり、これらの方法によるときには、トレハロースの含量が高い製品を大量且つ効率的に得ることができる。

【0075】斯くして得られるトレハロース及びトレハロースを含む糖組成物は、糖質甘味剤の還元性を嫌う種々の物品に広範な用途を有し、例えば、飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として極めて有用である。

【0076】以下、2~3 の実施例により、この発明による組換え型耐熱性酵素の製造方法と非還元性糖質の変換方法を具体的に説明する。

【0077】

【実施例 A-1 組換え型耐熱性酵素の製造】500 ml 容フラスコに 1% (w/v) ポリペプトン、0.5% (w/v) 酵母エキス、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム及び水からなる液体培地 (pH 7.0) を約 100 ml ずつとり、120℃で 20 分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、アンピシリンを 50  $\mu$ g/ml 加え

た。この液体培地に実験例 3-2 の方法で得た形質転換体 SU18 を接種し、37℃、130 rpm で 24 時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、30 l 容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約 18 l とり、同様に滅菌し、37℃まで冷却後、アンピシリンを 50  $\mu$ g/ml 加え、上記で得た種培養液を 1% (v/v) 接種し、37℃で 24 時間通気攪拌培養した。

【0078】培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物 1 l 当たり、約 350 単位の組換え型耐熱性酵素が産生していた。この上清を実験例 1 の方法により精製したところ、比活性約 720 単位/mg 蛋白質の組換え型耐熱性酵素を 1 ml 当たり約 230 単位含む水溶液が約 12 ml 得られた。

【0079】

【実施例 A-2 組換え型耐熱性酵素の製造】

【0080】

【実施例 A-2 (a) 形質転換体の作製】実験例 3-2 の方法により得た組換え DNA pSU18 を制限酵素 Ssp I 及び Ban III で切断し、配列表の配列番号 2 に示す塩基配列における第 22 乃至 740 番目までの塩基配列を含む約 720 塩基対の DNA 断片を得た。この DNA 断片に予め制限酵素 Ssp I 及び Ban III で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『Bluescript II SK (+)』を加え、T4 DNA リガーゼの存在下、4℃で一晩静置して連結させることにより、第一の組換え DNA を得た。

【0081】別途、常法により化学合成した 5'-CTGCAGTTT TTTTAATAAAAATCAGGAGGA-3'、5'-AAAAATATGTTTTCGTT CGGTGGAAT-3'、5'-ATTTCCACCGAACGAAAA-3'、5'-CATATTTT TTCCTCCTGA-3' 及び 5'-TTTTATTAAAAAACTGCAG-3' で表わされる塩基配列を有する 5 種類のオリゴヌクレオチドを適量混合し、100℃、65℃、37℃及び 20℃でそれぞれ 20 分間インキュベートしてアニールさせた。得られた配列表の配列番号 6 に示す塩基配列と配列番号 2 に示す塩基配列における第 1 乃至 21 番目までの塩基配列からなる 55 塩基対の二本鎖 DNA に予め制限酵素 Ssp I で切断しておいた第一の組換え DNA を上記と同様にして連結させることにより、配列表の配列番号 6 に示す塩基配列と配列番号 2 の塩基配列における第 1 乃至 740 番目までの塩基配列を含む第二の組換え DNA を得た。

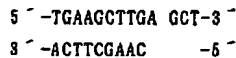
【0082】次に、実験例 3-2 の方法により得た組換え DNA pSU18 を制限酵素 Ban III 及び Bst XI により切断し、得られた配列表の配列番号 2 に示す塩基配列における第 741 乃至 1,668 番目までの塩基配列を含む約 1,600 塩基対の DNA 断片

に、予め制限酵素Ban I I I及びBst X Iにより切断しておいたプラスミドベクター『Bluescript I I SK (+)』を連結させて第三の組換えDNAを得た。

【0083】別途、常法により化学合成した5'-AACAGAGGTGTTGGG-3'、5'-GTATATCAATTAGAATGAAGCTTGAGCT-3'、5'-CAAGCTTCATTCTA-3'及び5'-ATTGATATACCCCAACACCTCTGTT-3'で表わされる塩基配列を有する5種類のオリゴヌクレオチドを適量混合し、上記と同様にしてアニールさせた。得られた配列表の配列番号2に示す塩基配列における第1, 639乃至1, 668番目までの塩基配列を含む40塩基対の下記の化1に示す塩基配列の二本鎖DNAに予め制限酵素Hpa I及びSac Iにより切断しておいた第三の組換えDNAを連結させることにより、配列表の配列番号2に示す塩基配列における第741乃至1, 668番目までの塩基配列と化1に示す塩基配列を含む第四の組換えDNAを得た。

【0084】

【化1】



【0085】次に、第二の組換えDNAを制限酵素Pst I及びBan I I Iにより切断して得られた配列表の配列番号2に示す塩基配列における第1乃至740番目までの塩基配列を含んでなる約770塩基対のDNA断片及び第四の組換えDNAを制限酵素Ban I I I及びHind I I Iにより切断して得られた配列表の配列番号2に示す塩基配列における第741乃至1, 668番目までの塩基配列を含んでなる約930塩基対のDNA断片を予め制限酵素Pst I及びHind I I Iにより切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』にT4 DNAリガーゼにより連結させ、配列番号2に示す塩基配列を含むこの発明による組換えDNA pSU19を得た。

【0086】斯くして得られた組換えDNA pSU19を実験例3-2の方法に準じて宝酒造製コンピテントセル『BMH71-18』に導入し、当該酵素をコードするDNAを含むこの発明による形質転換体SU19を得た。実験例3-2の方法により形質転換体SU19を培養し、培養物から菌体を採取し、溶出させた組換えDNAを精製し、分析したところ、組換えDNA pSU19は約6,300塩基対からなり、図6に示すように、当該酵素をコードする1,668塩基対からなるDNA断片を制限酵素Ssp Iによる切断部位の下流に連結していた。

【0087】

【実施例A-2 (b) 形質転換体による組換え型耐熱性酵素の製造】形質転換体SU19を2% (w/v) マ

ルトース、4% (w/v) 『N-Z-Soyペプトン』(シグマ製)、2% (w/v) 酵母エキス、0.5% (w/v) 燐酸二水素ナトリウム、50μg/mlアンピシリン及び水からなる液体培地(pH7.0)を用いた以外は実施例A-1と同様にして培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物1l当たり約800,000単位の組換え型耐熱性酵素が産生していた。この上清を実験例1の方法により精製したところ、比活性約720単位/mg蛋白質の組換え型耐熱性酵素を1ml当たり約3,200単位含む水溶液が約1,850ml得られた。

【0088】実験例2の方法によりこの精製酵素の性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量54,000乃至64,000ダルトンと等電点電気泳動で約5.6乃至6.6に等電点を示すとともに、水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても実質的に失活しないなど、供与体微生物であるスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)が産生する耐熱性酵素とほぼ同じ理化学的性質を有していた。

【0089】

【実施例B-1 トレハロースを含むシロップ状物への変換】

【0090】

【実施例B-1 (a) 耐熱性非還元性糖質生成酵素の調製】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 燐酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、硫酸を加えてpH3.0に調整した。この液体培地にスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)を接種し、75℃、130rpmで24時間培養して第一の種培養液を得た。10l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、第一の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養して第二の種培養液を得た。その後、300l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約250lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、上記で得た第二の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量100l/分で42時間通気攪拌培養した。

【0091】約170lの培養物をSF膜により膜濾過し、遠心分離して得られた湿重量約258gの菌体を10mM燐酸緩衝液(pH7.0)300mlに浮遊させ、超音波を印加して菌体を破碎した。破碎物を10,

0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離し、得られた約 3 0 0 m l の上清に硫酸アンモニウムを 7 0 % 飽和になるように加え、4℃で 2 4 時間静置後、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離した。沈澱部を採取し、適量の 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) に溶解し、新鮮な同じ緩衝液に対して 2 4 時間透析後、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離して酵素活性ある約 3 0 0 m l の上清を得た。

【0 0 9 2】この上清を予め 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) で平衡化させておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE-トヨパール』約 3 6 0 m l のカラムに負荷し、0 M から 0 . 3 M に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) を通液した。塩化ナトリウム濃度 0 . 1 M 付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、1 M 硫酸アンモニウムを含む 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) に対して 1 0 時間透析後、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め 1 M 硫酸アンモニウムを含む 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) で平衡化させておいた東ソー製疎水クロマトグラフィー用ゲル『ブチルトヨパール 6 5 0』約 3 5 0 m l のカラムに負荷し、1 M から 0 M に下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、カラムに 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) を通液した。

【0 0 9 3】硫酸アンモニウム濃度 0 . 8 M 付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、0 . 2 M 塩化ナトリウムを含む 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) に対して 1 6 時間透析し、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め 0 . 2 M 塩化ナトリウムを含む 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) で平衡化しておいたセプラコル製ゲル濾過クロマトグラフィー用ゲル『ウルトロゲル AcA 4 4』約 3 5 0 m l のカラムに通液した。溶出液から酵素活性ある画分を採取し、1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) に対して 1 6 時間透析し、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) で平衡化しておいたファルマシア製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『Mono Q』約 1 0 m l のカラムに負荷し、0 M から 0 . 2 M に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8 . 5) を通液した。そして、塩化ナトリウム濃度 0 . 1 M 付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、トレハロースの製造に供した。このようにして得た非還元性糖質生成酵素の比活性は約 8 1 単位/mg 蛋白質であり、収量は培養物 1 l 当たり約 0 . 2 4 単位であった。

【0 0 9 4】なお、この発明を通じて、非還元性糖質生成酵素の活性は、次の方法により測定した活性値 (単位) で表示する。すなわち、基質としてマルトペンタオ

ースを 1 . 2 5 % (w/v) 含む 5 0 m M 酢酸緩衝液 (pH 5 . 5) を 4 m l とり、これに適宜希釈した酵素液を 1 m l 加え、6 0℃で 6 0 分間インキュベートして反応させた後、1 0 0℃で 3 0 分間加熱して反応を停止させる。反応物を 1 m l とり、脱イオン水で 1 0 倍希釈した後、ソモギーネルソン法により還元力を測定する。同時に、予め 1 0 0℃で 3 0 分間加熱して失活させておいた酵素液を使用する系を設け、上記と同様に処置して対照とする。非還元性糖質生成酵素の 1 単位とは、上記反応条件下において、1 分間にマルトペンタオース 1  $\mu$  m o l に相当する還元力を消失させる酵素量と定義する。

#### 【0 0 9 5】

【実施例 B-1 (b)】トレハロースを含むシロップ状物への変換】とうもろこし澱粉を 1 5 % (w/w) になるように水中に懸濁し、炭酸カルシウムを 0 . 1 % (w/w) 加えた。pH 6 . 0 に調整後、ノボ・ノルディスク・インダストリー製  $\alpha$ -アミラーゼ剤『ターマミール 6 0 L』を澱粉固形分当たり 0 . 2 % (w/w) 加え、9 5℃で 1 5 分間反応させて澱粉を糊化・液化した。澱粉液化液を 1 2 0℃で 3 0 分間オートクレーブして酵素を失活させ、5 8℃に冷却し、pH 5 . 5 に調整後、澱粉固形分 1 g 当たり、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を 3 , 0 0 0 単位、実施例 B-1 (a) の方法で得た耐熱性非還元性糖質生成酵素を 3 . 0 単位、実施例 A-1 の方法で得た組換え型耐熱性酵素を 5 . 0 単位加え、6 4 時間反応させた。反応物を 9 7℃で 3 0 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮し、濃度約 6 0 % (w/w) のシロップ状物を原料澱粉固形分当たり約 9 0 % の収量で得た。

【0 0 9 6】粘度と還元性低く、トレハロース、グルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、グルコース、マルトース、マルトトリオース及びマルトテトラオース以上のマルトオリゴ糖を固形分当たりそれぞれ 7 1 . 0 %、2 . 9 %、1 . 0 %、4 . 9 %、1 0 . 5 %、8 . 2 % 又は 1 . 5 % 含む本品は、まろやかで上品な甘味に加えて適度の保湿性を有し、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

#### 【0 0 9 7】

【実施例 B-2】トレハロースを含む粉状物への変換】本例では、実施例 B-1 のシラップ状物におけるトレハロース含量を高めるべく、イオン交換樹脂によるカラム分画を実施した。すなわち、東京有機化学工業製ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1 0 1 6』を水中に懸濁し、内径 5 . 4 c m、長さ 5 m のジャケット付きステンレス製円筒管 4 本に均一に充填し、円筒管を直列に連結してカラムの全長を 2 0 m とした。カラム内温



度を 55℃ に保ちつつ、実施例 B-1 (b) の方法で得たシロップ状物を適宜希釈し、カラムに対して 5% (v/v) 負荷し、55℃ の温水を SV0.13 の流速で通液してシロップ状物に含まれる糖質を分画した。溶出液の糖組成を分析し、トレハロース含量の高い画分のみを採取し、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、固形分当たりトレハロースを約 97% 含む粉状物を原料固形分当たり約 55% の収量で得た。

【0098】 まろやかで上品な甘味を有しながらも、実質的な還元性を有しない本品は、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0099】

【実施例 B-3 結晶性トレハロースを含む粉状物への変換】 実施例 B-2 の方法で得たトレハロース含量の高い画分を約 75% (w/w) まで濃縮後、助晶機に移し、緩やかに攪拌しながら助晶して晶出率約 45% のマスキットを得た。約 85℃ の温風を噴霧乾燥塔の上部から下方に向かって送風しつつ、このマスキットを約 150 kg/cm<sup>2</sup> の加圧下、噴霧乾燥塔の上部に設けた噴霧ノズルより噴霧乾燥塔の下方に向かって噴霧する一方、噴霧乾燥塔の底部に設けた金網コンベア上に捕集した結晶性粉状物を、コンベア下部より約 45℃ の温風を送風しつつ、噴霧乾燥塔外に徐々に搬出した。その後、粉状物を熟成塔に移し、約 40℃ の温風を送風しながら 10 時間熟成して結晶化と乾燥を完了した。このようにして、トレハロース含水結晶を含む粉状物を原料固形分当たり約 90% の収率で得た。

【0100】 まろやかで上品な甘味を有しながらも、実質的な還元性を有しない本品は、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0101】

【実施例 B-4 結晶性トレハロースを含む粉状物への変換】 タピオカ澱粉を 36% (w/w) になるように水中に懸濁し、懸濁液に炭酸カルシウムを 0.1% (w/w) 加えた。pH 6.0 に調整後、ノボ・ノルディスク・インダストリー製  $\alpha$ -アミラーゼ剤『ターマミール 60 L』を澱粉固形分当たり 0.2% (w/w) 加え、95℃ で 15 分間反応させて澱粉を糊化・液化した。澱粉液化液を 120℃ で 30 分間オートクレーブして酵素を失活させ、58℃ に冷却し、pH 5.2 に調整後、澱粉固形分 1 g 当たり、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を 2,000 単位、実施例 B-1 (a) の方法で得た耐熱性非還元性糖質生成酵素を 2.5 単位、実施例 A-1 の方法で得た組換え型耐熱性酵素を 5.0 単位加え、72 時間反応させた。反応物を 97℃ で 30 分間加熱して酵素を失活させた後、50℃ に冷却し、ナガセ生

化学工業製グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』を澱粉固形分 1 g 当たり 10 単位加え、40 時間反応させた。反応物を 95℃ で 10 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、約 60% (w/w) まで濃縮して、固形分当たりトレハロースを 75.5% 含むシロップ状物を得た。

【0102】 シロップ状物を約 84% (w/w) まで濃縮後、助晶機に移し、種晶としてトレハロース含水結晶を固形分当たり約 2% (w/w) 加え、緩やかに攪拌しながら助晶して晶出率約 45% のマスキットを得た。このマスキットをプラスチック製バットに分注し、室温で 3 日間静置して固化・熟成させた後、バットからブロック状物を取り出し、切削機により粉碎して、トレハロース含水結晶を含む固状物を原料澱粉固形分当たり約 90% の収量で得た。

【0103】 実質的に吸湿性を示さず、取扱い易い本品は、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0104】

【実施例 B-5 結晶性トレハロースを含む粉状物への変換】 馬鈴薯澱粉を 6% (w/w) になるように水中に懸濁し、ナガセ生化学工業製  $\alpha$ -アミラーゼ剤『ネオスピターゼ』を澱粉固形分当たり 0.01% (w/w) 加え、pH 6.2 に調整後、温度 85 乃至 90℃ に保ちつつ 1 時間反応させて澱粉を糊化・液化させた。澱粉液化液を 120℃ で 10 分間加熱して酵素を失活させ、60℃ に冷却後、pH を 5.5 に調整し、澱粉 1 g グラム当たり、ノボ・ノルディスク・インダストリー製ブルナーゼ剤『プロモザイム 200 L』を 500 単位、実施例 B-1 (a) の方法で得た耐熱性非還元性糖質生成酵素を 3.0 単位、実施例 A-1 の方法で得た組換え型耐熱性酵素を 5.0 単位加え、48 時間反応させた。反応物を 97℃ で 30 分間して酵素を失活させ、50℃、pH 5.0 に調整後、ナガセ生化学工業製グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』を澱粉固形分 1 g 当たり 10 単位加え、40 時間反応させた。反応物を 95℃ で 10 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃度約 60% (w/w) まで濃縮して、固形分当たりトレハロースを 79.3% 含むシロップ状物を得た。

【0105】 このシロップ状物をナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂としてオルガノ製『C6000』を用いた以外は実施例 B-2 と同様にカラム分画し、固形分当たりトレハロースを約 95% 含む画分を採取し、約 75% (w/w) まで濃縮後、実施例 B-4 と同様に助晶し、得られたマスキットのブロック状物を粉碎して、トレハロース含水結晶を含む粉状物を原料澱粉固形分当たり約 70% の収量で得た。



【0106】実質的に吸湿性を示さず、取扱い易い本品は、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0107】

【実施例 B-6 無水結晶トレハロースを含む粉状物への変換】林原生物化学研究所製アミロース『EX-I』1重量部を水15重量部に加熱溶解し、溶液を65℃、pH5.5に調整後、アミロース固形分1g当たり実施例B-1(a)の方法により得た耐熱性非還元性糖質精製酵素を2.0単位と実施例A-2の方法により得た組換え型耐熱性酵素を6.0単位加え、48時間反応させた。反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、50℃、pH5.0に調整後、ナガセ生化学工業製グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』をアミロース固形分1g当たり10単位加え、さらに40時間反応させた。新たに生じた反応物を95℃で10分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、常法にしたがって濾過し、活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製後、濃度約60% (w/w) まで濃縮して固形分当たりトレハロースを82.2%含むシロップ状物を得た。

【0108】このシロップ状物を実施例B-5と同様にしてカラム分画し、固形分当たりトレハロースを98%含む画分を採取し、減圧下で加熱しながら約85% (w/w) まで濃縮し、種晶として無水結晶トレハロースを固形分当たり約2% (w/w) 加え、攪拌しながら120℃で5分間混合後、プラスチック製バットに分注し、100℃で真空乾燥して結晶化させた。その後、バットからブロック状物を取り出し、切削機により粉碎したところ、結晶化率約70%の無水結晶トレハロースを含む水分含量約0.3% (w/w) の固状物を原料アミロース固形分当たり約70%の収率で得た。

【0109】無水結晶トレハロースには含水物の水分を吸収し、トレハロース含水結晶に変わる性質があるので、無水結晶トレハロース含量の高い本品は、飲食物、

#### 配列

```

Met Phe Ser Phe Gly Gly Asn Ile Glu Lys Asn Lys Gly Ile Phe Lys Leu
1           5           10          15
Trp Ala Pro Tyr Val Asn Ser Val Lys Leu Lys Leu Ser Lys Lys Leu Ile
20          25          30
Pro Met Glu Lys Asn Asp Glu Gly Phe Phe Glu Val Glu Ile Asp Asp Ile
35          40          45          50
Glu Glu Asn Leu Thr Tyr Ser Tyr Ile Ile Glu Asp Lys Arg Glu Ile Pro
55          60          65
Asp Pro Ala Ser Arg Tyr Gln Pro Leu Gly Val His Asp Lys Ser Gln Leu
70          75          80          85
Ile Arg Thr Asp Tyr Gln Ile Leu Asp Leu Gly Lys Val Lys Ile Glu Asp
90          95          100
Leu Ile Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Ser Gln Glu Gly Asn Phe
105         110         115

```

化粧品及び医薬品を始めとする組成物並びにそれら組成物の原料及び中間加工物を脱水又は乾燥するための安全な脱水剤として有用である。また、まろやかで上品な甘味を有する本品は、甘味剤、呈味改善剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品及び医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0110】

【発明の効果】以上説明したように、この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する新規な耐熱性酵素の発見に基づくものである。この発明は、組換えDNA技術により、この耐熱性酵素を大規模且つ効率的に生産する道を拓くものである。この発明の組換え型耐熱性酵素を使用する変換方法によるときには、雑菌汚染を懸念することなく、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質をトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に効率的に変換することができる。斯くして得られるトレハロースはまろやかで上品な甘味を有し、しかも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく、飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる実益がある。しかも、この発明の組換え型耐熱性酵素はアミノ酸配列まで明らかにされた酵素であり、飲食物や医薬品への配合使用を前提とするトレハロースの製造に安心して使用し得るものである。

【0111】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明であると言える。

【0112】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：556

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

31		32
Lys Gly Val Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Asp Leu Gly Ile Thr Gly		
120	125	130 135
Ile Glu Leu Met Pro Val Ala Gln Phe Pro Gly Asn Arg Asp Trp Gly Tyr		
140	145	150
Asp Gly Val Phe Leu Tyr Ala Val Gln Asn Thr Tyr Gly Gly Pro Trp Glu		
155	160	165 170
Leu Ala Lys Leu Val Asn Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Ala Val Ile Leu		
175	180	185
Asp Val Val Tyr Asn His Ile Gly Pro Glu Gly Asn Tyr Leu Leu Gly Leu		
190	195	200
Gly Pro Tyr Phe Ser Asp Arg Tyr Lys Thr Pro Trp Gly Leu Thr Phe Asn		
205	210	215 220
Phe Asp Asp Arg Gly Cys Asp Gln Val Arg Lys Phe Ile Leu Glu Asn Val		
225	230	235
Glu Tyr Trp Phe Lys Thr Phe Lys Ile Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val		
240	245	250 255
His Ala Ile Phe Asp Asn Ser Pro Lys His Ile Leu Gln Glu Ile Ala Glu		
260	265	270
Lys Ala His Gln Leu Gly Lys Phe Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn Asp		
275	280	285
Pro Lys Ile Val Lys Asp Asp Cys Gly Tyr Lys Ile Asp Ala Gln Trp Val		
290	295	300 305
Asp Asp Phe His His Ala Val His Ala Phe Ile Thr Lys Glu Lys Asp Tyr		
310	315	320
Tyr Tyr Gln Asp Phe Gly Arg Ile Glu Asp Ile Glu Lys Thr Phe Lys Asp		
325	330	335 340
Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys Tyr Ser Arg Tyr Arg Gly Arg Thr His Gly		
345	350	355
Ala Pro Val Gly Asp Leu Pro Pro Arg Lys Phe Val Val Phe Ile Gln Asn		
360	365	370
His Asp Gln Val Gly Asn Arg Gly Asn Gly Glu Arg Leu Ser Ile Leu Thr		
375	380	385 390
Asp Lys Thr Thr Tyr Leu Met Ala Ala Thr Leu Tyr Ile Leu Ser Pro Tyr		
395	400	405
Ile Pro Leu Ile Phe Met Gly Glu Glu Tyr Tyr Glu Thr Asn Pro Phe Phe		
410	415	420 425
Phe Phe Ser Asp Phe Ser Asp Pro Val Leu Ile Lys Gly Val Arg Glu Gly		
430	435	440
Arg Leu Lys Glu Asn Asn Gln Met Ile Asp Pro Gln Ser Glu Glu Ala Phe		
445	450	455
Leu Lys Ser Lys Leu Ser Trp Lys Ile Asp Glu Glu Val Leu Asp Tyr Tyr		
460	465	470 475
Lys Gln Leu Ile Asn Ile Arg Lys Arg Tyr Asn Asn Cys Lys Arg Val Lys		
480	485	490
Glu Val Arg Arg Glu Gly Asn Cys Ile Thr Leu Ile Met Glu Lys Ile Gly		
495	500	505 510
Ile Ile Ala Ser Phe Asp Asp Ile Val Ile Asn Ser Lys Ile Thr Gly Asn		
515	520	525
Leu Leu Ile Gly Ile Gly Phe Pro Lys Lys Leu Lys Lys Asp Glu Leu Ile		
530	535	540

Lys Val Asn Arg Gly Val Gly Val Tyr Gln Leu Glu

545

550

555

【0113】配列番号: 2

配列の型: 核酸

配列の長さ: 1668

配列

ATGTTTTCGT TCGGTGAAA TATTGAAAA AATAAAGCTA TCTTTAAGTT ATGGGCACCT 60  
 TATGTTAATA GTGTTAAGCT GAAGTTAAGC AAAAACTTA TTCCAATGGA AAAAAACGAT 120  
 GAGGGATTTT TCGAAGTAGA AATAGACGAT ATCGAGGAAA ATTAAACCTA TTCTTATATT 180  
 ATAGAAGATA AGAGAGAGAT ACCTGATCCC GCATCAGCAT ATCAACCTTT AGGAGTTCAT 240  
 GACAAATCAC AACTTATAAG AACAGATTAT CAGATTCTTG ACCTTGGAAA AGTAAAAATA 300  
 GAAGATCTAA TAATATATGA ACTCCACGTT GGTACTTTTT CCCAAGAAGG AAATTTCAAA 360  
 GGAGTAATAG AAAAGTTAGA TTACCTCAAG GATCTAGGAA TCACAGGAAT TGAAGTATG 420  
 CCTGTGGCAC AATTTCAGG GAATAGAGAT TGGGGATACG ATGGTGTTTT TCTATACGCA 480  
 GTTCAAATA CTTATGGCGG ACCATGGGAA TTGGCTAAGC TAGTAAACGA GGCACATAAA 540  
 AGGGGAATAG CCGTAATTTT GGATGTTGTA TATAATCATA TAGGTCCTGA GGGAAATTAC 600  
 CTTTTAGGAT TAGGTCCTTA TTTTTCAGAC AGATATAAAA CTCCATGGGG ATTAACATTT 660  
 AATTTTGATG ATAGGGGATG TGATCAAGTT AGAAAATTCA TTTTAGAAAA TGTCGAGTAT 720  
 TGGTTAAGA CCTTTAAAT CGATGGTCTG AGACTGGATG CAGTTCATGC AATTTTGTAT 780  
 AATTCGCCTA AGCATATCCT CCAAGAGATA GCTGAAAAAG CCCATCAATT AGGAAAATTT 840  
 GTTATTGCTG AAAGTGATT AAATGATCCA AAAATAGTAA AAGATGATTG TGGATATAAA 900  
 ATAGATGCTC AATGGGTGA CGATTTCAC CACGCAGTTC ATGCATTAT AACCAGAGAA 960  
 AAAGATTATT ATTACCAGGA TTTTGAAGG ATAGAAGATA TAGAGAAAAC TTTTAAAGAT 1020  
 GTTTTGTGTT ATGATGGAAA GTATTCTAGA TACAGAGGAA GAACTCATGG TGCTCCTGTA 1080  
 GGTGATCTTC CACCACGTAA ATTTGTAGTC TTCATACAAA ATCAGCATCA AGTAGGAAAT 1140  
 AGAGGAAATG GGGAAAGACT TTCCATATTA ACCGATAAAA CGACATACCT TATGGCAGCC 1200  
 ACACTATATA TACTCTCACC GTATATACCG CTAATATTTA TGGGCGAGGA ATATTATGAG 1260  
 ACGAATCCTT TTTTCTTCTT CTCTGATTTT TCAGATCCCG TATTAATTAA GGGTGTGTA 1320  
 GAAGTAGAC TAAAGGAAAA TAATCAAATG ATAGATCCAC AATCTGAGGA AGCGTCTTA 1380  
 AAGAGTAAAC TTTCATGGAA AATTGATGAG GAAGTTTATG ATTATTATAA ACAACTGATA 1440  
 AATATCAGAA AGAGATATAA TAATTGTAAG AGGTAAGG AAGTTAGGAG AGAAGGGAAC 1500  
 TGTATTACTT TGATCATGGA AAAAATAGGA ATAATTGCAT CGTTTGATGA TATTGTAATT 1560  
 AATTCTAAAA TTACAGGTAA TTTACTTATA GGCATAGGAT TTCCGAAAAA ATTGAAAAAA 1620  
 GATGAATTAA TTAAGGTAA CAGAGGTGTT GGGGTATATC AATTAGAA 1668

【0114】配列番号: 3

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 30

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

フラグメントの種類: N末端フラグメント

配列

Met Phe Ser Phe Gly Gly Asn Ile Glu Lys Asn Lys Gly Ile Phe Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Trp Ala Pro Tyr Val Asn Ser Val Lys Leu Lys Leu Ser  
 20 25 30

【0115】配列番号: 4

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 19

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

フラグメントの種類: 中間部フラグメント

配列

Ile Asp Ala Gln Trp Val Asp Asp Phe His His Ala Val His Ala Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Thr Lys

【0116】配列番号: 5

配列の型: 核酸

配列の長さ: 1668

50 鎖の数: 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列の特徴

起源

生物名：スルフォロブス・アシドカルダリウス

株名：ATCC33909

## 配列

```

ATG TTT TCG TTC GGT GGA AAT ATT GAA AAA AAT AAA GGT ATC TTT AAG 48
Met Phe Ser Phe Gly Gly Asn Ile Glu Lys Asn Lys Gly Ile Phe Lys
1           5           10          15
TTA TGG GCA CCT TAT GTT AAT AGT GTT AAG CTG AAG TTA AGC AAA AAA 96
Leu Trp Ala Pro Tyr Val Asn Ser Val Lys Leu Lys Leu Ser Lys Lys
          20          25          30
CTT ATT CCA ATG GAA AAA AAC GAT GAG GGA TTT TTC GAA GTA GAA ATA 144
Leu Ile Pro Met Glu Lys Asn Asp Glu Gly Phe Phe Glu Val Glu Ile
          35          40          45
GAC GAT ATC GAG GAA AAT TTA ACC TAT TCT TAT ATT ATA GAA GAT AAG 192
Asp Asp Ile Glu Glu Asn Leu Thr Tyr Ser Tyr Ile Ile Glu Asp Lys
          50          55          60
AGA GAG ATA CCT GAT CCC GCA TCA CGA TAT CAA CCT TTA GGA GTT CAT 240
Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Ser Arg Tyr Gln Pro Leu Gly Val His
65          70          75          80
GAC AAA TCA CAA CTT ATA AGA ACA GAT TAT CAG ATT CTT GAC CTT GGA 288
Asp Lys Ser Gln Leu Ile Arg Thr Asp Tyr Gln Ile Leu Asp Leu Gly
          85          90          95
AAA GTA AAA ATA GAA GAT CTA ATA ATA TAT GAA CTC CAC GTT GGT ACT 336
Lys Val Lys Ile Glu Asp Leu Ile Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr
          100          105          110
TTT TCC CAA GAA GGA AAT TTC AAA GGA GTA ATA GAA AAG TTA GAT TAC 384
Phe Ser Gln Glu Gly Asn Phe Lys Gly Val Ile Glu Lys Leu Asp Tyr
          115          120          125
CTC AAG GAT CTA GGA ATC ACA GGA ATT GAA CTG ATG CCT GTG GCA CAA 432
Leu Lys Asp Leu Gly Ile Thr Gly Ile Glu Leu Met Pro Val Ala Gln
          130          135          140
TTT CCA GGG AAT AGA GAT TGG GGA TAC GAT GGT GTT TTT CTA TAC GCA 480
Phe Pro Gly Asn Arg Asp Trp Gly Tyr Asp Gly Val Phe Leu Tyr Ala
          145          150          155          160
GTT CAA AAT ACT TAT GGC GGA CCA TGG GAA TTG GCT AAG CTA GTA AAC 528
Val Gln Asn Thr Tyr Gly Gly Pro Trp Glu Leu Ala Lys Leu Val Asn
          165          170          175
GAG GCA CAT AAA AGG GGA ATA GCC GTA ATT TTG GAT GTT GTA TAT AAT 576
Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Ala Val Ile Leu Asp Val Val Tyr Asn
          180          185          190
CAT ATA GGT CCT GAG GGA AAT TAC CTT TTA GGA TTA GGT CCT TAT TTT 624
His Ile Gly Pro Glu Gly Asn Tyr Leu Leu Gly Leu Gly Pro Tyr Phe
          195          200          205
TCA GAC AGA TAT AAA ACT CCA TGG GGA TTA ACA TTT AAT TTT GAT GAT 672
Ser Asp Arg Tyr Lys Thr Pro Trp Gly Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asp
          210          215          220
AGG GGA TGT GAT CAA GTT AGA AAA TTC ATT TTA GAA AAT GTC GAG TAT 720
Arg Gly Cys Asp Gln Val Arg Lys Phe Ile Leu Glu Asn Val Glu Tyr
225          230          235          240
TGG TTT AAG ACC TTT AAA ATC GAT GGT CTG AGA CTG GAT GCA GTT CAT 768

```

37  
 Trp Phe Lys Thr Phe Lys Ile Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His  
 245 250 255  
 GCA ATT TTT GAT AAT TCG CCT AAG CAT ATC CTC CAA GAG ATA GCT GAA 816  
 Ala Ile Phe Asp Asn Ser Pro Lys His Ile Leu Gln Glu Ile Ala Glu  
 260 265 270  
 AAA GCC CAT CAA TTA GGA AAA TTT GTT ATT GCT GAA AGT GAT TTA AAT 864  
 Lys Ala His Gln Leu Gly Lys Phe Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn  
 275 280 285  
 GAT CCA AAA ATA GTA AAA GAT GAT TGT GGA TAT AAA ATA GAT GCT CAA 912  
 Asp Pro Lys Ile Val Lys Asp Asp Cys Gly Tyr Lys Ile Asp Ala Gln  
 290 295 300  
 TGG GTT GAC GAT TTC CAC CAC GCA GTT CAT GCA TTC ATA ACC AAA GAA 960  
 Trp Val Asp Asp Phe His His Ala Val His Ala Phe Ile Thr Lys Glu  
 305 310 315 320  
 AAA GAT TAT TAT TAC CAG GAT TTT GGA AGG ATA GAA GAT ATA GAG AAA 1008  
 Lys Asp Tyr Tyr Tyr Gln Asp Phe Gly Arg Ile Glu Asp Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 ACT TTT AAA GAT GTT TTT GTT TAT GAT GGA AAG TAT TCT AGA TAC AGA 1056  
 Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys Tyr Ser Arg Tyr Arg  
 340 345 350  
 GGA AGA ACT CAT GGT GCT CCT GTA GGT GAT CTT CCA CCA CGT AAA TTT 1104  
 Gly Arg Thr His Gly Ala Pro Val Gly Asp Leu Pro Pro Arg Lys Phe  
 355 360 365  
 GTA GTC TTC ATA CAA AAT CAC GAT CAA GTA GGA AAT AGA GGA AAT GGG 1152  
 Val Val Phe Ile Gln Asn His Asp Gln Val Gly Asn Arg Gly Asn Gly  
 370 375 380  
 GAA AGA CTT TCC ATA TTA ACC GAT AAA ACG ACA TAC CTT ATG GCA GCC 1200  
 Glu Arg Leu Ser Ile Leu Thr Asp Lys Thr Thr Tyr Leu Met Ala Ala  
 385 390 395 400  
 ACA CTA TAT ATA CTC TCA CCG TAT ATA CCG CTA ATA TTT ATG GGC GAG 1248  
 Thr Leu Tyr Ile Leu Ser Pro Tyr Ile Pro Leu Ile Phe Met Gly Glu  
 405 410 415  
 GAA TAT TAT GAG ACG AAT CCT TTT TTC TTC TTC TCT GAT TTC TCA GAT 1296  
 Glu Tyr Tyr Glu Thr Asn Pro Phe Phe Phe Phe Ser Asp Phe Ser Asp  
 420 425 430  
 CCC GTA TTA ATT AAG GGT GTT AGA GAA GGT AGA CTA AAG GAA AAT AAT 1344  
 Pro Val Leu Ile Lys Gly Val Arg Glu Gly Arg Leu Lys Glu Asn Asn  
 435 440 445  
 CAA ATG ATA GAT CCA CAA TCT GAG GAA GCG TTC TTA AAG AGT AAA CTT 1392  
 Gln Met Ile Asp Pro Gln Ser Glu Glu Ala Phe Leu Lys Ser Lys Leu  
 450 455 460  
 TCA TGG AAA ATT GAT GAG GAA GTT TTA GAT TAT TAT AAA CAA CTG ATA 1440  
 Ser Trp Lys Ile Asp Glu Glu Val Leu Asp Tyr Tyr Lys Gln Leu Ile  
 465 470 475 480  
 AAT ATC AGA AAG AGA TAT AAT AAT TGT AAA AGG GTA AAG GAA GTT AGG 1488  
 Asn Ile Arg Lys Arg Tyr Asn Asn Cys Lys Arg Val Lys Glu Val Arg  
 485 490 495  
 AGA GAA GGG AAC TGT ATT ACT TTG ATC ATG GAA AAA ATA GGA ATA ATT 1536  
 Arg Glu Gly Asn Cys Ile Thr Leu Ile Met Glu Lys Ile Gly Ile Ile  
 500 505 510

39

40

GCA TCG TTT GAT GAT ATT GTA ATT AAT TCT AAA ATT ACA GGT AAT TTA 1584

Ala Ser Phe Asp Asp Ile Val Ile Asn Ser Lys Ile Thr Gly Asn Leu

515

520

525

CTT ATA GGC ATA GGA TTT CCG AAA AAA TTG AAA AAA GAT GAA TTA ATT 1632

Leu Ile Gly Ile Gly Phe Pro Lys Lys Leu Lys Lys Asp Glu Leu Ile

530

535

540

AAG GTT AAC AGA GGT GTT GGG GTA TAT CAA TTA GAA

1668

Lys Val Asn Arg Gly Val Gly Val Tyr Gln Leu Glu

545

550

555

【0117】配列番号:6

配列の長さ:34

配列の型:核酸

10 鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:オリゴヌクレオチド

配列

CTGCAGTTTT TTAATAAAAT CAGGAGGAAA AAAT

34

【図面の簡単な説明】

【図1】スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATC C33909)が産生する耐熱性酵素の至適温度を示す図である。

【図2】スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATC C33909)が産生する耐熱性酵素の至適pHを示す図である。

【図3】スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATC C33909)が産生する耐熱性酵素の熱安定性を示す

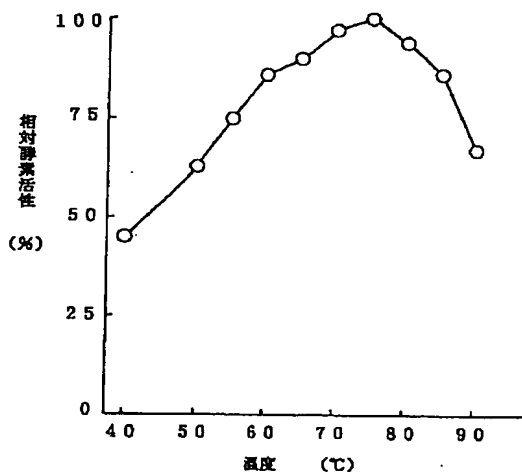
図である。

【図4】スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATC C33909)が産生する耐熱性酵素のpH安定性を示す図である。

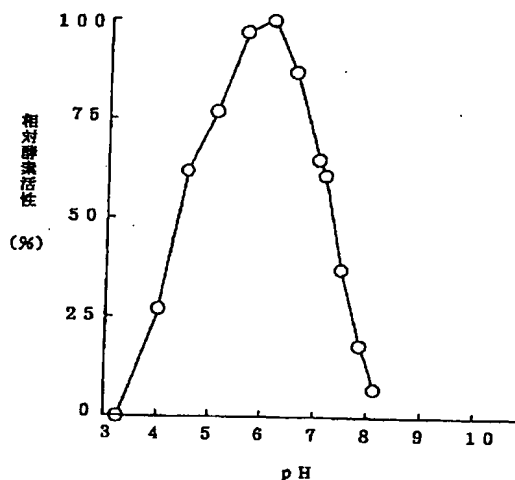
【図5】この発明による組換えDNAであるpSU18の制限酵素地図である。

【図6】この発明による組換えDNAであるpSU19の制限酵素地図である。

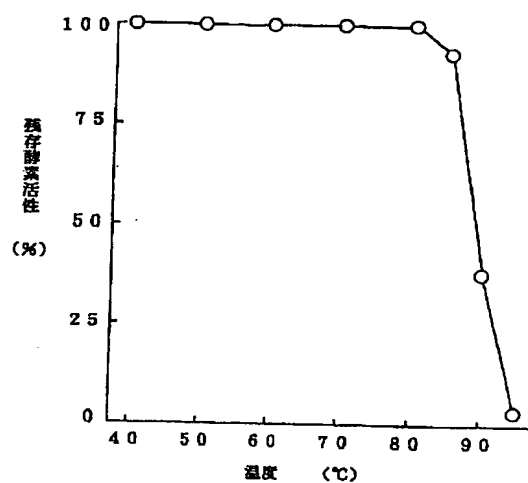
【図1】



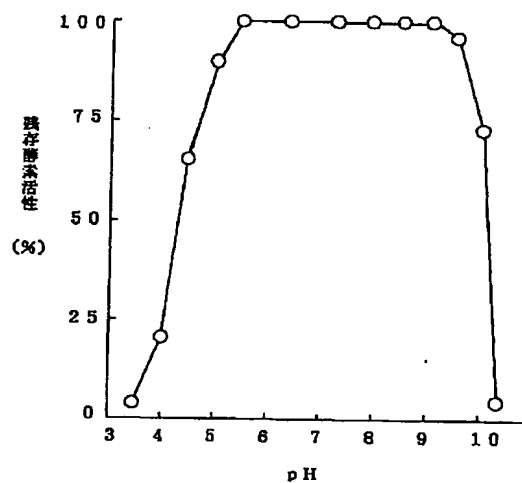
【図2】



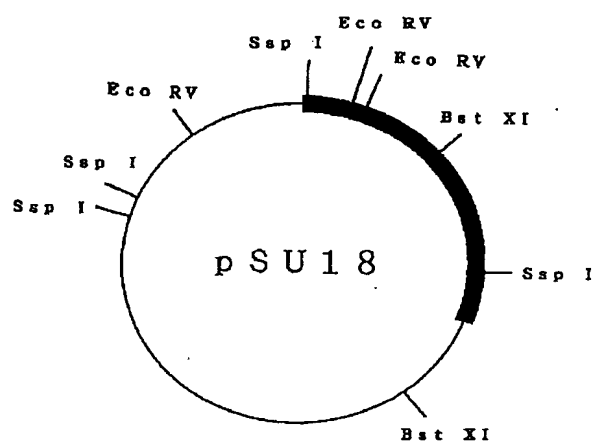
【図 3】



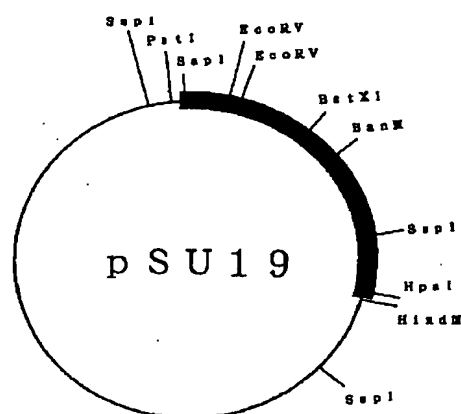
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

//(C12N 9/24

C12R 1:19 )

(C12N 1/21

C12R 1:19 )

(C12N 15/09

C12R 1:01 )

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

ZNA